(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0074210
(43) 공개일자 2013년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/60* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0142147
(22) 출원일자 2011년12월26일
심사청구일자 2011년12월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
황병국
서울특별시 서초구 서초1동 1641-1 서초삼성래미안아파트 103동 1405호
김낙현
서울특별시 서대문구 영천동 삼호아파트 105동 603호
(74) 대리인
김선애

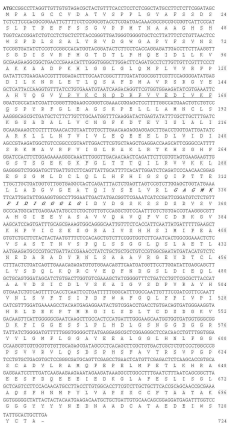
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **병저항성 관련 아르지닌 디카르복실라아제 유전자 CaADC1 및 이를 이용한 형질전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 병저항성 관련 유전자 *CaADC1* (*Capsicum annuum Arginine Decarboxylase 1*), 이를 이용한 식물병 저항성 탐색방법 및 형질전환 식물체에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 상기 유전자는 세균의 비병원성 단백질 AvrBsT와 상호작용하는 신규 저항성 관련 유전자로서 병원균의 공격에 대한 식물체의 방어 반응 및 병저항성 식물체의 효율적이고 효과적인 분자적 육종을 위한 유전재료로서 유용하게 사용될 수 있으며, 식물병 저항성에 대한 탐색 및 작용 기작을 규명하는 도구로 이용될 수 있는 이점이 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ008027
부처명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 고추에서 병저항성관련유전자의 분리와 기능분석
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자(*CaADC1*).

청구항 2

서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*CaADC1*).

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(CaADC1).

청구항 4

제2항 기재의 유전자(*CaADC1*)를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

식물체로부터 mRNA 분리하여 제2항 기재의 유전자(*CaADC1*)의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성을 탐색하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물병 저항성에 관련된 신규 유전자인 아르지닌 디카르복실라아제 유전자 *CaADC1* 유전자 (*CaADC1*: *Capsicum annuum Arginine Decarboxylase*), 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되어 세균의 비병원성 단백질 AvrBsT와 상호작용하는 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 고추 유래의 *CaADC1* 유전자의 염기서열 및 그에 따른 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 생물적(biotic) 또는 비생물적 (abiotic) 처리시 저항성 관련 유전자 *CaADC1*의 차별적인 발현 여부를 확인하는 식물체의 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 바이러스 유도 유전자 억제(Virus-induced gene silencing) 기술과 애기장대에 형질전환을 통하여 *CaADC1* 유전자를 각각 발현억제(knock-down)와 과발현(overexpression)시키고, 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물에서 일시적 발현 (transient expression) 시켜서 폴리아민 (polyamine) 형성 증가 및 병 저항성 유도를 확인하여 병 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지구가 지진, 홍수, 폭설 등의 자연재해로 크게 피해를 받고 있고 온난화 현상으로 병해충의 발생이 증가되어 인간 및 자연환경에 유해한 화학농약의 과도한 사용으로 환경오염과 인축에 대한 유해성 때문에 친환경 녹색성장이 일반에게 화두가 되고 있다. 따라서 모든 산업과 사회의 전반적인 생활 양식이 친환경적으로 전환하는 것이 의무화 되어가는 추세이다. 농업에 있어서 친환경 녹색성장을 이룩하기 위해서는, 식물병의 방제를 위해 농약과 같은 화학적 방제가 필요하지 않은 병저항성 품종의 개량 및 육종 방법을 찾는 것이 절실하다. 식물의 병저항성 반응 또는 환경적 스트레스에 대한 내성을 가지는 식물의 방어관련 기작 연구는 지금까지 알려져 있지 않은 생체 내 기작을 규명하는 과학기술적 가치를 지닌다. 또한 식물저항성 관련 유전자의 정보는 작물의 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공될 수 있을 뿐 아니라 전통적 유전육종에도 사용될 수 있는 장점을 지니고 있다.

[0003] 우리나라에서 집약적으로 재배되는 고추 (*Capsicum annuum L.*)는 주요 경제 작물로써 다양한 식물병에 피해를 받고 있으며, 이에 대한 식물의 방어 반응을 분자세포학적으로 연구하는 것이 필요하다. 고추 세균성점무늬병원균과 고추와의 상호작용에서 방어반응에 관여하는 유전자의 분자적 클로닝과 기능 분석은 고추의 병방어 반응 경로의 이해를 증진시키고, 저항성관련 유전자를 고추식물에서 발현시킨 병저항성 형질전환식물의 개발을 위한 유전자원의 토대가 된다.

[0004] 식물체는 병원균에 감염되면 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 활성화하는데, 이러한 방어기작은 병원체에 대한 기주세포의 인식을 시발점으로 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응, 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 폴리아민 (polyamine) 등 여러 종류의 2차 대사산물과 항균성 물질을 생성하고, 병방어 관련 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재 저항성 반응시 생성되는 대사산물, 특히 직접 식물에 보호효과를 주는 폴리아민과 같은 2차 대사산물이 식물병 저항성에 어떻게 기여하는지 이들 2차 대사과정과 관련된 유전자에 대한 연구가 매우 미흡한 실정이다. 따라서 폴리아민 생성에 역할하는 식물병저항성 관련 아르지닌 디카르복실라아제(ADC) 유전자를 동정하고 클로닝 하여 분석하는 것이 병저항성 작물 품종을 육종하는데 실질적으로 기여할 것으로 기대된다.

[0005] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 홍성회의 한국농화학회지 제39권 제2호(1996)에는 벼의 아르기닌 디카르복실라아제 DNA 클론의 재조합 및 염기서열 분석이 기재되어 있으나, 고추에서 유래된 ADC 유전자에 대해서는 개시되어 있지 않다. 또한, 미국 특허공보 US 7,328,861 (2007.07.03)에는 다양한 환경스트레스에 대한 향상된 내성을 갖는 식물체 및 폴리아민 메타폴리즘 관련 효소 유전자로서 야생호박에서 유래된 ADC 유전자가 공개되어 있으나, 고추 유래의 ADC 유전자에 대해서는 개시되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 미국 특허공보 US 7,328,861 (2007.07.03)

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 홍성회 외, 한국농화학회지 제39권 제2호 pp. 112-117(1996)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 아르지닌 디카르복실라아제 (*CaADC1*: *Capsicum annuum Arginine Decarboxylase 1*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 *CaADC1* 유전자를 이용하여 식물병, 화학물질 또는 환경스트레스에 대한 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0010] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaADC1* 유전자를 이용하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 상기 목적은, 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang) 식물이 고추 세균성 점무늬병

(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되어 세균의 비병원성 단백질 AvrBsT와 상호작용하는 신규 저항성 관련 유전자 *CaADC1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 병원균, 화학물질 처리를 통하여 *CaADC1*의 발현 여부를 조사하고, VIGS를 통한 *CaADC1*의 유전자가 억제된 고추식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaADC1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.

[0013] 따라서 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자(*CaADC1*)를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*CaADC1*)를 제공한다.

[0015] 나아가 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(CaADC1)을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 유전자(*CaADC1*)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S:*CaADC1*, 또는 pTRV:*CaADC1*이다.

[0017] 나아가, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 식물세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법 (Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0018] 또한, 본 발명은 식물체로부터 mRNA 분리하여 *CaADC1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.

[0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0020] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리를 이용하여 이스트 투-하이브리드 스크리닝(yeast two-hybrid screening)을 수행하여 점무늬병균의 비병원성 단백질인 AvrBsT(NCBI Accession No. GQ266402; Nak Hyun Kim et al., MPMI Vol. 23, No. 8, 2010, pp. 1069-1082.)와 상호작용하는 cDNA 클론을 동정하였다. 이 클론을 이스트(yeast) 세포에서 분리 정제하여 유전자의 염기서열을 해독함으로써, *CaADC1*으로 명명된 고추 녹광품종의 아르지닌 디카르복실라아제 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

[0021] 본 발명에 의한 CaADC1 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 아르지닌 디카르복실라아제 (arginine decarboxylase)에서 전형적으로 나타나는 아르지닌 디카르복실라아제 시그네처 도메인 (arginine decarboxylase family 2 signature domain)을 가지고 있었고, 담배 (*Nicotiana tabacum*)의 아르지닌 디카르복실라아제 (accession no. AAQ14851)와는 단백질 수준에서 86 %, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 아르기닌 디카르복실라아제 (accession no. NP_195197)와는 단백질 수준에서 71 %의 상동성을 나타냄으로써 신규임을 알 수 있었다 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, nucleotide blast program).

[0022] 다음에, 본 발명은 생물적/화학적 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 *CaADC1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질(환경스트레스) 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성, 비병원성 세균 그리고 고추 역병의 난균 등의 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 화학적 처리는 식물 호르몬인 살리실산, 메틸자스몬산 및 에칠렌을 예로 들 수 있다. 상기 *CaADC1* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블럿, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자가 식물 병원균 또는 화학물질 처리에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 3 및 도 4 참조). 따라서 본 발

명에 의한 *CaADC1* 유전자는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기의 *CaADC1* 유전자 발현을 억제하는 재조합 벡터를 이용하여 특이적으로 *CaADC1* 유전자가 억제된 고추 식물체를 제작하고 병 감수성이 증대되는 것을 확인하고, *CaADC1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성이 증가하는 것을 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 *CaADC1* 유전자 발현을 증가시키는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법도 제공한다.

[0024] 보다 구체적으로 본 발명은 바이러스 유도 유전자 억제 기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되어지는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaADC1* 유전자를 TRV 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV:*CaADC1*를 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaADC1*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 저항성이 감소되는 것을 확인하였다 (도 6 ~ 도 8 참조).

[0025] 나아가 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S:*CaADC1*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaADC1* 유전자의 식물체 병저항성 증가를 확인하고 병저항성 형질전환 식물체를 제공할 수 있었다(도 12 및 도 13 참조).

[0026] 상술한 바와 같이 본 발명에서 *CaADC1*가 고추 식물의 병저항성 조절에 중추적 역할을 한다는 것을 확인하고 *CaADC1*의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질 (PR protein)의 유전자 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학적 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0027] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되어 세균의 비병원성 단백질 AvrBsT와 상호작용하는 식물병 저항성 관련 유전자인 *CaADC1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물병 또는 화학물질 스트레스 저항성 탐색방법을 제공할 수 있게 되었다.

[0028] 아울러 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자의 발현을 억제하거나, 과발현시켜 식물병 저항성에 기여함을 확인하여 본 발명에 의한 *CaADC1*는 병 저항성 식물체의 육종을 위한 재료로서 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 본 발명은 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종 (*Capsicum annnuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 *CaADC1* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 고추 녹광 품종의 각 기관에서 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

도 3은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaADC1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 4는 살리실산(salicylic acid), 메칠자스몬산(methyl jasmonic acid) 및 에칠렌(ethylene)을 처리한 후 시간별로 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 바이러스 유도 유전자 억제(virus-induced gene silencing; VIGS)의 방법을 사용하여 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 병 감수성이 증대되어 감수성이 병징이 확대된 것을 나타낸 도면이고,

도 6은 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 각각 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 감염 고추 잎 조직에서의 세균 생장을 나타낸 그래프이고,

도 7은 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 본 발명에 의한 *CaADC1*의 효과적인 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 나타낸 결과를 나타낸 그래프이고,

도 8은 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 폴리아민 축적량을 정량한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 9는 재조합벡터 pBIN35S:*CaADC1*, pBIN35S:*CaADC1* K154A 그리고 pBIN35S:*avrBsT*와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물에서 *CaADC1*, *CaADC1* K154A 그리고 avrBsT 유전자를 여러 조합으로 과발현시켰을 때 세포사멸 양상을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 10은 *CaADC1*, *CaADC1* K154A 그리고 avrBsT 유전자를 여러 조합으로 과발현시킨 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물에서 산화질소의 축적을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 11은 *CaADC1*, *CaADC1* K154A 그리고 avrBsT 유전자를 여러 조합으로 과발현시킨 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물에서 폴리아민의 축적을 확인한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 12는 형질전환 애기장대 식물에서 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자가 과발현되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 13은 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC 3000) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 생장을 검정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0031] **[실시예 1] *CaADC1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정**

[0032] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 아르지닌 디카르복실라아제 (*CaADC1*: *C*apsicum *a*nnuum *A*rginine *D*ecarboxylase *1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0033] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성세포사멸반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0034] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리를 이용하여 이스트 투-하이브리드 스크리닝(yeast two-hybrid screening)을 수행하여 점무늬병균의 비병원성 단백질인 AvrBsT와 상호작용하는 cDNA 클론을 동정하였다. 이 클론을 이스트(yeast) 세포에서 분리 정제하여 수득하였다.

[0035] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaADC1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 아르지닌 디카르복실라아제 (*CaADC1*) 유전자로 명명하였다. CaADC1 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 아르지닌 디카르복실라아제 (arginine decarboxylase)에서 전형적으로 나타나는 아르지닌 디카르복실라아제 시그네처 도메인 (arginine decarboxylase family 2 signature domain)을 가지고 있었고, 담배 (*Nicotiana tabacum*)의 아르지닌 디카르복실라아제 (accession no. AAQ14851)와는 단백질 수준에서 86 %, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 아르기닌

디카르복실라아제 (accession no. NP_195197)와는 단백질 수준에서 71 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, nucleotide blast program). 확인된 *CaADC1*의 유전자 염기서열(서열번호 1)과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1에 나타내었다.

[0036] **[실시예 2] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 *CaADC1* 유전자의 발현 탐색**

[0037] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaADC1* 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0038] **[단계 1]**

[0039] 먼저 저항성 탐색 방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 YN(Yeast- Nutrient) 배지에서 배양한 후, 10^8 cfu/㎖의 농도로 6엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 3, 4엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 침투시켜 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실 처리 하였다. 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 접종된 잎을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

[0040] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaADC1* 유전자에 클레나우 효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 α-^{32}P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24 시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다. 이렇게 동위원소가 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막(Hybond N+)에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 (Hybond N+) 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 동위원소가 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 발현 유무와 정도를 알아볼 수 있게 하였다.

[0041] 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일 량의 RNA 시료가 로딩 되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 3에 나타내었으며 실험의 결과 *CaADC1* 유전자는 비병원성 고추세균성점무늬병 접종 후 10시간 이후에 발현이 시작되고 접종 후 25시간 이후에는 점차 발현이 감소하였다.

[0042] **[실시예 3] 식물 호르몬 및 화학적 유도체에 의한 *CaADC1* 유전자의 유도 발현**

[0043] 본 발명의 *CaADC1* 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 식물 호르몬 및 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0044] **[단계 1]**

[0045] 먼저, *CaADC1* 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 살리실산(salicylic acid), 메칠자스몬산(methyl jasmonic acid) 및 에칠렌(ethylene)을 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다. 모든 실험에 6엽기의 고추 잎이 이용되었다.

[0046] 살리실산은 5 mM, 메칠자스몬산은 100 μM의 농도로 고추 잎에 스프레이 하는 방법으로 처리하였으며 메칠자스몬산을 처리한 후에는 밀봉 처리하였다. 에칠렌은 20 μl/L의 농도로 하여 기체상태로 식물체가 있는 밀폐된 유리 용기에 주입하는 방법으로 처리하였다. 각각의 식물들은 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시킨 후 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다.

[0047] 실시예 1에서 수득된 *CaADC1* 유전자에 클레나우 효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 α-^{32}P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다. 이렇게 동위원소가 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막(Hybond N+)에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 (Hybond N+) 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 동위원소가 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 발현 유무와 정도를 알아볼 수 있게 하였다. 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일 량의 RNA 시료가 로딩 되었음을 확인하였다.

[0048] 실험의 결과 *CaADC1* 유전자는 도 4에서 보이는 것과 같이 살리실산 처리 후 발현이 5시간부터 10시간 발현되었다가 감소한 뒤 20시간부터 다시 유도되어 25시간까지 발현이 강하게 유지되는 것을 관찰할 수 있었고, 에칠렌 처리 이후 20시간에 발현이 되었고, 메칠자스몬산 처리 후에는 1시간에 발현이 유도되어 25시간 이후까지 발현이 강하게 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0049] **[실시예 4] *CaADC1* 유전자 발현의 억제에 의한 병 저항성의 변화**

[0050] 고추식물에서 *CaADC1* 유전자의 발현이 특이적으로 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 발현감소 여부 및 병에 대한 감수성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaADC1* 유전자를 바이러스 유도 유전자 억제(VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaADC1* 유전자를 TRV2 벡터에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV:*CaADC1*를 제조하였다 (참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113).

[0051] 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV:*CaADC1*를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법 (electrophoration)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추 유묘 (seedling)의 떡잎에 주사기를 이용, 엽육주사 (infiltration) 방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 *CaADC1* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[0052] **[단계 1]**

[0053] *CaADC1*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 *CaADC1*의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV:00 벡터를 접종한 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 10^7 과 10^8 cfu ml^{-1}의 농도로 접종한 후 2일 이후 접종 잎의 병징을 관찰하였고(도 5), 5 x 10^4 cfu ml^{-1}로 접종하여 접종 후 0, 3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다(도 6).

[0054] 그리고, 병원균 10^7 cfu ml^{-1} 농도로 접종 후 1, 2일 후에 실험구와 대조구의 감염 잎에서 RNA를 추출하여 실시간 알티-피시알 (real-time RT-PCR)을 통해 *CaADC1*의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종 시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다(도 7). 또한 동일한 시점에 시료로부터 폴리아민을 GC-Mass 기법으로 정량하여 병 저항성 관련 대사산물 축적의 변동사항을 관찰하였다 (도 8).

[0055] 도 5에서와 같이 실험결과 VIGS로 *CaADC1*의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 비병원성 균주 접종시 대조구 식물에서 2일째 국부적 저항성 반응으로 세포사멸이 나타나지만 *CaADC1*의 발현이 억제된 식물에서는 국부적 세포사멸이 현저히 감소한 것을 관찰하였다. 그리고 도 6에서와 같이 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 *CaADC1*의 발현이 억제된 식물에서 비병원성 세균의 생장이 현저히 증가하였다. 알티-피시알 시험 결과 도 7과 같이, *CaADC1*이 억제된 식물에서 효과적으로 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, *CaPR1* 등(Young Jin Kim et al., PHYSIOLOGIA PLANTARUM 108: 51-60. 2000; Chang-Jin Park et al., The Plant Journal (2004) 37, 186-198)과 같은 병 저항성 마커 유전자의 발현이 줄어든 것으로 나타났다. 폴리아민 축적량을 도 8과 같이 확인한 결과 *CaADC1*의 발현이 억제된 식물에서는 폴리아민의 축적이 현저히 감소하였다.

[0056] **[실시예 5] CaADC1 과 AvrBsT 동시발현시 세포사멸 변화**

[0057] 모델식물로 사용되는 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물체에서 AvrBsT 단백질은 세포사멸을 일으킨다. AvrBsT와 상호작용하는 CaADC1이 AvrBsT가 일으키는 세포사멸에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 동시에 발현시켜서 세포사멸의 변동사항과 세포사멸 관련물질인 산화질소 (NO) 그리고 폴리아민의 축적량을 확인하였다. 실시예 1에서 수득한 *CaADC1* 및 CaADC1의 효소기능 불활성 돌연변이 *CaADC1* K154A 유전자를 식물 과발현용 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaADC1*, pBIN35S:*CaADC1* K154A을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S:*CaADC1*, pBIN35S:*CaADC1* K154A을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기 천공법 (electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 기존

의 pBIN35S:*avrBsT* 함유 균주와 섞어 4주차 담배(*Nicotiana benthamiana*)잎에 접종하여 일시적으로 *CaADC1* 또는 *CaADC1* K154A와 *avrBsT* 유전자의 과다발현을 유도시켜 시험을 수행하였다.

[0058] **[단계 1]**

[0059] *CaADC1*을 과발현하는 재조합벡터 (35S:*CaADC1*), 효소기능이 불활성화된 *CaADC1* K154A를 과발현하는 재조합벡터 (35S:*CaADC1* K154A), *avrBsT*를 과발현하는 재조합벡터 (35S:*avrBsT*)와 어떠한 유전자도 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:*EV*)를 이용하여 형질전환시킨 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)을 Yeast-Peptone (YEP: yeat extract 10g, peptone 10g, sodium chloride 5g/L) 배지에서 진탕배양한 뒤 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 균주현탁액 농도를 흡광도 600(optical density 600, OD_{600})에서 0.2 또는 0.05로 맞추고 이를 여러 조합으로 섞어 담배(*Nicotiana benthamiana*) 잎에 각각 접종하고 그 결과를 도 9에 나타내었다. 접종 3일째, *avrBsT*을 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 고농도로 접종한 잎에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 *avrBsT*을 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 저농도로 접종한 잎에서는 UV램프 하에서만 차이가 나는 수준의 세포사멸이 일어났다. *CaADC1*나 *CaADC1* K154A를 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 고농도로 접종한 잎에서는 세포사멸이 나지 않았다. 그런데 *avrBsT*와 *CaADC1*를 저농도로 섞어 접종한 잎에서 세포사멸이 avrBsT를 고농도로 접종한 수준으로 나타났다. *avrBsT*와 *CaADC1* K154A를 저농도로 섞어 접종한 잎에서는 세포사멸이 avrBsT를 저농도로 단독 접종한 수준으로 나타났다.

[0060] **[단계 2]**

[0061] 상기와 같은 조합으로 접종된 잎에서 세포사멸관련 물질인 산화질소 축적량을 접종후 2일 후 산화질소(NO) 특이적 형광염색시약인 DCF-2DA로 염색하여 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, *CaADC1*이나 *avrBsT*를 고농도로 접종하거나 *CaADC1*와 *avrBsT*를 저농도로 섞어 접종한 잎에서는 산화질소 축적량이 높은 현상을 관찰하였다. *CaADC1* K154A 고농도, avrBsT 저농도, *CaADC1*와 *avrBsT*를 저농도로 섞어 접종한 잎에서는 산화질소가 거의 축적되지 않은 것으로 나타났다.

[0062] **[단계 3]**

[0063] 상기와 같은 조합으로 접종된 잎에서 폴리아민 축적량을 접종후 1, 2일 후 GC-mass 기기로 측정하였다. 도 11과 같이 *CaADC1*이나 *avrBsT*를 고농도로 접종하거나 *CaADC1*와 *avrBsT*를 저농도로 섞어 접종한 잎에서는 접종후 2일째에 모든 폴리아민의 축적량이 높은 현상을 관찰하였다. *CaADC1* K154A 고농도, avrBsT 저농도, *CaADC1*와 *avrBsT*를 저농도로 섞어 접종한 잎에서는 폴리아민이 대조구와 비슷한 수준으로 축적된 것으로 나타났다.

[0064] **[실시예 6] *CaADC1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaADC1* 유전자의 과다발현에 의한 애기장대 식물의 병 저항성 변화**

[0065] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaADC1* 유전자의 과다발현시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 5에서 제작한 pBIN35S:*CaADC1*를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법 (electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 *CaADC1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 형질전환 애기장대를 제작하고 아래와 같은 시험을 수행하였다.

[0066] 본 발명에 의한 *CaADC1* 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 상기 *CaADC1* 유전자가 과다 발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaADC1* 유전자의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 12에 나타내었다. #13, #15, #17 는 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타내고, 실험결과 *CaADC1* 유전자가 과다 발현됨을 관찰할 수 있었다.

[0067] 상기와 같이 *CaADC1*이 과다 발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하고 감염조직에서 세균생장을 관찰한 결과 *CaADC1* 유전자가 과다발현된 식물에서 세균 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다 (도 13).

[0068] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

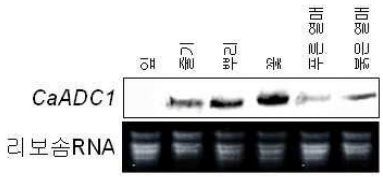
따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

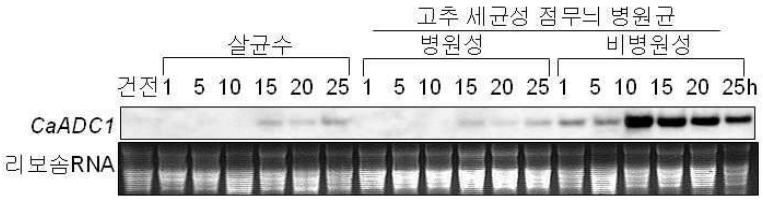
도면1

```
ATGCCGGCCTTAGGTTGTTGTGTAGACGCTACTGTTTCACCTCCTCTCGGCTATGCCTTCTCTTCGGATAGC
 M  P  A  L  G  C  C  V  D  A  T  V  S  P  P  L  G  Y  A  F  S  S  D  S   24
TCTCTTCCCACGCCGGAATTCTTTTCCTCCGGCGTACCTCCGATGACAAACGCCGCCGCCGGTCATTCCCAT
 S  L  P  T  P  E  F  F  S  S  G  V  P  P  M  T  N  A  A  A  G  H  S  H   48
TGGTCACCGGATCTGTCCTCTGCTCTTTACCGGGTTGATGGGTGGGGTGCTCCTTATTTCTCTGTTAACTCC
 W  S  P  D  L  S  S  A  L  Y  R  V  D  G  W  G  A  P  Y  F  S  V  N  S   72
TCCGGTGATATCTCCGTCCGGCCACATGGTACGGATACTCTTCCTCACCAGGAGATTGACCTTCTTAAGGTT
 S  G  D  I  S  V  R  P  H  G  T  D  T  L  P  H  Q  E  I  D  L  L  K  V   96
GCGAAGAAGGCGGCTGACCCGAAACATTTGGGTGGGCTTGGACTTCAGATGCCTCTTGTTGTTCGTTTCCCT
 A  K  K  A  A  D  P  K  H  L  G  G  L  G  L  Q  M  P  L  V  V  R  F  P  120
GATATTCTGAAGAACCGTTTGGAGACTTTGCAATCGGCTTTTGATATGGCGGTTCGTTCCAGGGGATATGAG
 D  I  L  K  N  R  L  E  T  L  Q  S  A  F  D  M  A  V  R  S  R  G  Y  E  144
GCTCATTACCAAGGTGTTTATCCTGTGAAATGTAATCAAGACAGGTTCGTGGTGGAAGATATCGTGAAATTC
 A  H  Y  Q  G  V  Y  P  V  K  C  N  Q  D  R  F  V  V  E  D  I  V  K  F  168
GGATCGCCATATCGATTCGGGTTGGAAGCCGGGTCGAAACCGGAGCTCCTTTTGGCCATGAACTGTCTGTCC
 G  S  P  Y  R  F  G  L  E  A  G  S  K  P  E  L  L  L  A  M  N  C  L  S  192
AAGGGCAGCGCTGATGCTCTTCTTGTTTGCAATGGTTTCAAGGATACTGAGTATATTTCGCTTGCTTTGATC
 K  G  S  A  D  A  L  L  V  C  N  G  F  K  D  T  E  Y  I  S  L  A  L  I  216
GCAAGAAAGCTCCTTTTGAACACTGTAATTGTGCTTGAACAAGAGGAGGAGCTTGACCTGGTGATTGATATC
 A  R  K  L  L  L  N  T  V  I  V  L  E  Q  E  E  E  L  D  L  V  I  D  I  240
AGCCGTAAGATGGCTGTCCGGCCCGTAATTGGACTTCGTGCTAAGCTGAGGACCAAGCATTCGGGCCATTTT
 S  R  K  M  A  V  R  P  V  I  G  L  R  A  K  L  R  T  K  H  S  G  H  F  264
GGATCCACTTCTGGAGAAAAGGGCAAATTTGGGTTGACAACAACTCAGATTCTTCGTGTAGTGAAGAAGTTG
 G  S  T  S  G  E  K  G  K  F  G  L  T  T  T  Q  I  L  R  V  V  K  K  L  288
GAGGGGTCTGGGATGCTTGATTGTCTTCAGTTATTGCATTTTCACATTGGATCTCAGATCCCAACAACGGAG
 E  G  S  G  M  L  D  C  L  Q  L  L  H  F  H  I  G  S  Q  I  P  T  T  E  312
TTGCTTGCTGATGGTGTTGGTGAGGCCACTCAGATTTACTCTGAGTTAGTCCGTCTTGGAGCTGGTATGAAA
 L  L  A  D  G  V  G  E  A  T  Q  I  Y  S  E  L  V  R  L  G  A  G  M  K  336
TTCATTGATATTGGAGGTGGCCTTGGAATTGACTATGACGGTTCGAAATCATCCGATTCGGATGTCTCTGTT
 F  I  D  I  G  G  G  L  G  I  D  Y  D  G  S  K  S  S  D  S  D  V  S  V  360
GCCCATGGCATTGAGGAATATGCCTCTGCTGTTGTCCAGGCTGTCCAATTTGTCTGTGACCGTAAGGGCGTT
 A  H  G  I  E  E  Y  A  S  A  V  V  Q  A  V  Q  F  V  C  D  R  K  G  V  384
AAGCATCCAGTGATTTGCAGCGAAAGTGGCAGGGCAATTGTTTCTCACCATTCAATTATGATTTTTGAAGCT
 K  H  P  V  I  C  S  E  S  G  R  A  I  V  S  H  H  S  I  M  I  F  E  A  408
GTGTCTGCTTCTACTACTAATGTTTCTCCACAGCTGTCTTCCGGTGGTCTTCAATCACTGGCGGAAACTCTC
 V  S  A  S  T  T  N  V  S  P  Q  L  S  S  G  G  L  Q  S  L  A  E  T  L  432
AATGAAGATGCCCGTGCTGATTACCGAAACCTATCTGCTGCTGCTGTCCGTGGCGAATATGATACATGTCTC
 N  E  D  A  R  A  D  Y  R  N  L  S  A  A  A  V  R  G  E  Y  D  T  C  L  456
CTTTACTCTGATCAGTTGAAACAGAGATGTGTGGAACAGTTCAATGATGGTTCCTTGGATATTGAGCAGCTT
 L  Y  S  D  Q  L  K  Q  R  C  V  E  Q  F  N  D  G  S  L  D  I  E  Q  L  480
GCTGCAGTGGATAGCATCTGTGACTTGGTGTCGAAAGCTATCGGGGTTTCTGATCCTGTTCGCGCTTACCAT
 A  A  V  D  S  I  C  D  L  V  S  K  A  I  G  V  S  D  P  V  R  A  Y  H  504
GTGAATCTGTCAGTTTTCACCTCAATTCCTGATTTTTGGGCATTTGGCCAATTGTTTCCGATCGTTCCAATT
 V  N  L  S  V  F  T  S  I  P  D  F  W  A  F  G  Q  L  F  P  I  V  P  I  528
CATCGTTTGGATGAAAAGCCTACAATGAGAGGAATACTGTCGGACCTGACCTGTGACAGTGATGGGAAGGTA
 H  R  L  D  E  K  P  T  M  R  G  I  L  S  D  L  T  C  D  S  D  G  K  V  552
GACAAGTTCATTGGGGGCGAATCAAGCTTGCCACTCCATGATTTGGGAAGCAATGGTGGTGATGGTGGGCGG
 D  K  F  I  G  G  E  S  S  L  P  L  H  D  L  G  S  N  G  G  D  G  G  R  576
TATTATCTGGGGATGTTTTTGGGTGGGGCTTATGAGGAGGCGCTCGGAGGGCTCCACAACCTGTTTGGTGGA
 Y  Y  L  G  M  F  L  G  G  A  Y  E  E  A  L  G  G  L  H  N  L  F  G  G  600
CCAAGCGTCGTGCGTGTGTTGCAGAGCGATAGCCCTCACAGCTTCGCTGTGACTCGCTCTGTCCCTGGCCCG
 P  S  V  V  R  V  L  Q  S  D  S  P  H  S  F  A  V  T  R  S  V  P  G  P  624
TCCTGTGCTGACGTGCTCCGGGCGATGCAGTTCGAGCCTGAACTCATGTTCGAGACTCTCAAGCACCGTGCA
 S  C  A  D  V  L  R  A  M  Q  F  E  P  E  L  M  F  E  T  L  K  H  R  A  648
GAGGAATCCTTTGATCAAGAAGAAGAAATAGAAGATAAAGGCCTGGCCTTTGAATCTTTAATCAGCGGCTTA
 E  E  S  F  D  Q  E  E  E  I  E  D  K  G  L  A  F  E  S  L  I  S  G  L  672
GCTCAGTCCTTCCACAACATGCCTTACCTTGTGGCACCTTCGTCTTGCTGCTTCACCGCAGCAACCGCGAAA
 A  Q  S  F  H  N  M  P  Y  L  V  A  P  S  S  C  C  F  T  A  A  T  A  K  696
GGTGGGGGCTATTACTACTACAATGAAGACAATGCTGCTGATTGTGCAACAGCGGAGGATGAGATTTGGTCC
 G  G  G  Y  Y  Y  Y  N  E  D  N  A  A  D  C  A  T  A  E  D  E  I  W  S  720
TATTGCACTGCTTGA
 Y  C  T  A  -                                                            724
```

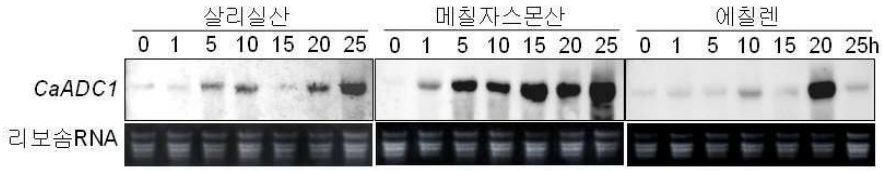
도면2



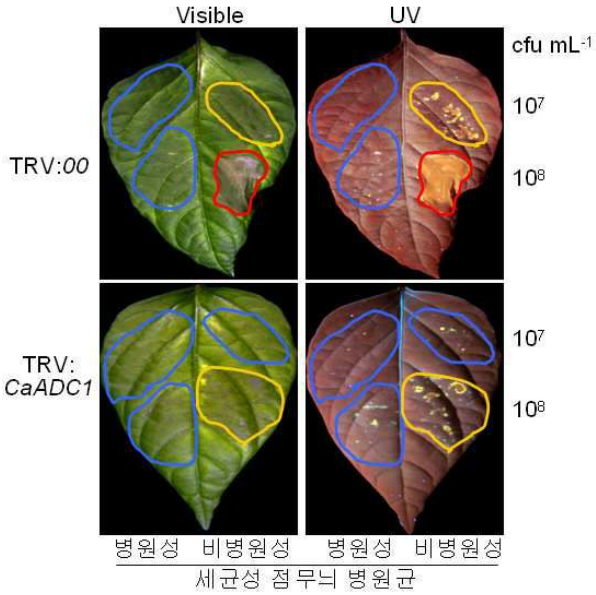
도면3


고추 세균성 점무늬 병원균
살균수
병원성
비병원성
건전 1 5 10 15 20 25 1 5 10 15 20 25 1 5 10 15 20 25h
CaADC1
리보솜RNA

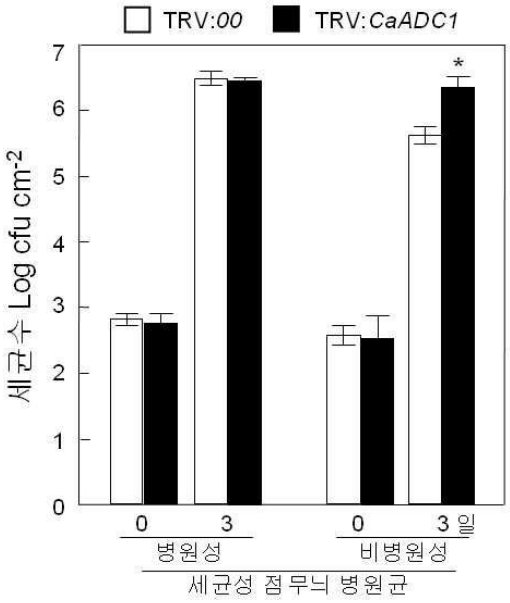
도면4


살리실산
메칠자스몬산
에칠렌
0 1 5 10 15 20 25 0 1 5 10 15 20 25 0 1 5 10 15 20 25h
CaADC1
리보솜RNA

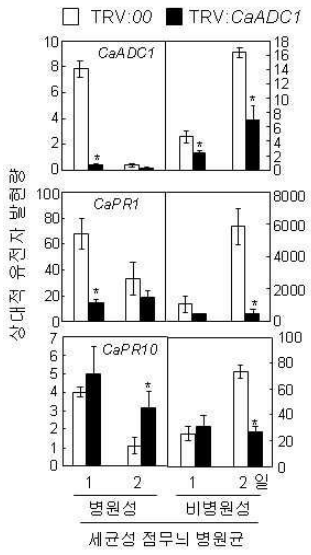
도면5


Visible
UV
cfu mL-1
TRV:00
TRV:
CaADC1
10^7
10^8
10^7
10^8
병원성 비병원성 병원성 비병원성
세균성 점무늬 병원균

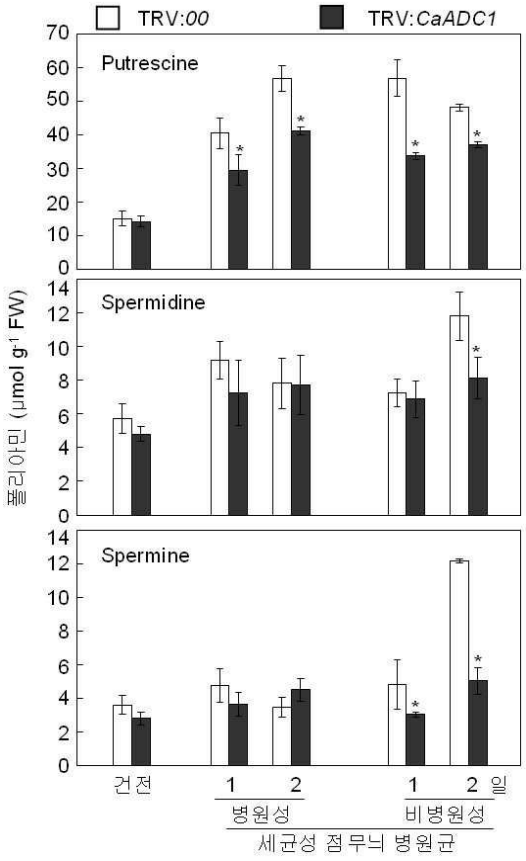
도면6


TRV:00
TRV:CaADC1
세균수 Log cfu cm-2
0
1
2
3
4
5
6
7
*
0
3
0
3 일
병원성
비병원성
세균성 점무늬 병원균

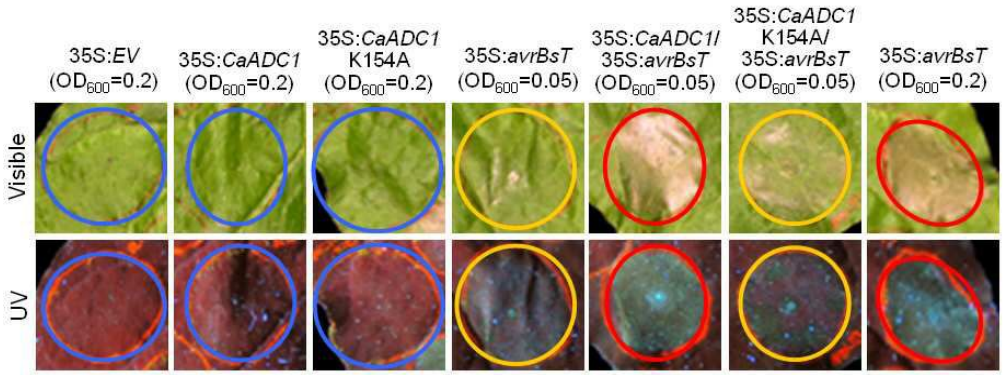
도면7


TRV:00
TRV:CaADC1
CaADC1
CaPR1
CaPR10
상대적 유전자 발현량
1
2
1
2 일
병원성
비병원성
세균성 점무늬 병원균

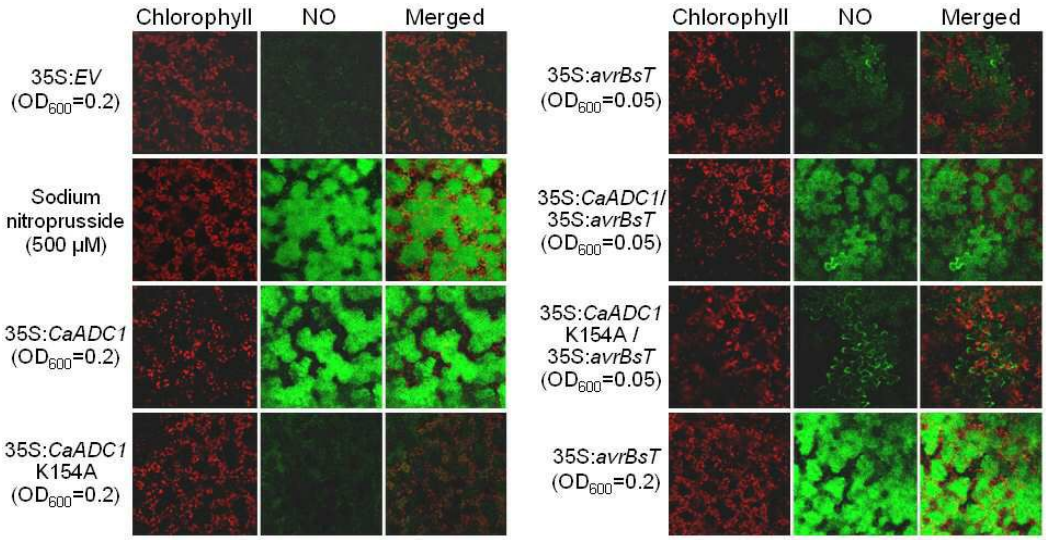
도면8


TRV:00
TRV:CaADC1
Putrescine
Spermidine
Spermine
폴리아민 (μmol g-1 FW)
건전
1
2
1
2 일
병원성
비병원성
세균성 점무늬 병원균

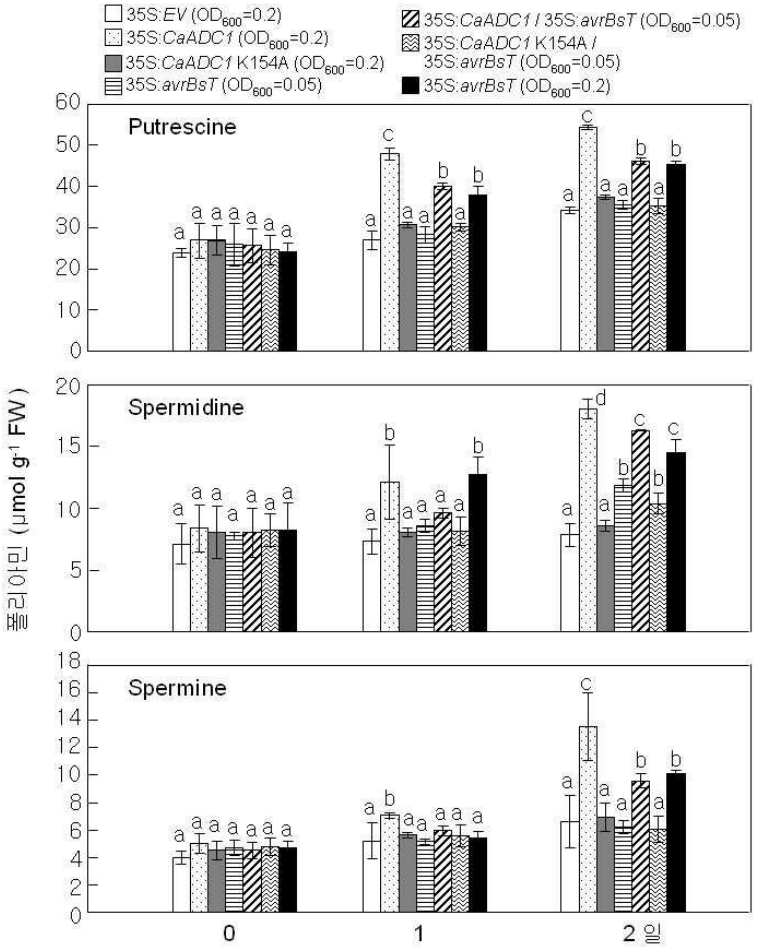
도면9


35S:EV (OD600=0.2)
35S:CaADC1 (OD600=0.2)
35S:CaADC1 K154A (OD600=0.2)
35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:CaADC1/ 35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:CaADC1 K154A/ 35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:avrBsT (OD600=0.2)
Visible
UV

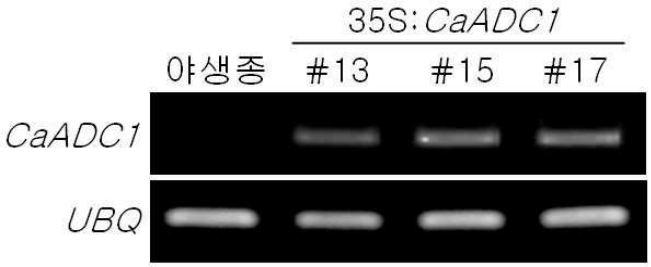
도면10


Chlorophyll
NO
Merged
35S:EV (OD600=0.2)
Sodium nitroprusside (500 μM)
35S:CaADC1 (OD600=0.2)
35S:CaADC1 K154A (OD600=0.2)
35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:CaADC1/ 35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:CaADC1 K154A / 35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:avrBsT (OD600=0.2)

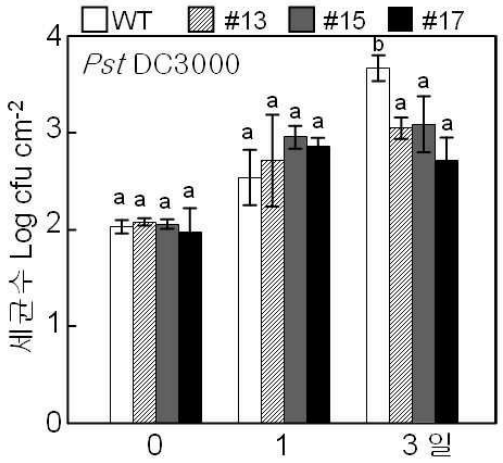
도면11


35S:EV (OD600=0.2)
35S:CaADC1 (OD600=0.2)
35S:CaADC1 K154A (OD600=0.2)
35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:CaADC1 / 35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:CaADC1 K154A / 35S:avrBsT (OD600=0.05)
35S:avrBsT (OD600=0.2)
Putrescine
Spermidine
Spermine
폴리아민 (μmol g-1 FW)
0
1
2 일

도면12



도면13



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Disease resistance-related arginine decarboxylase gene CaADC1, and transgenic plants using the same

<130> P11-111123-01-CaADC1

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2175

<212> DNA

<213> Capsicum annnuum L. cv. Nockwang

<400> 1

atgccggcct taggttgttg tgtagacgct actgtttcac ctcctctcgg ctatgccttc 60

tcttcggata gctctcttcc cacgccggaa ttcttttcct ccggcgtacc tccgatgaca 120

aacgccgccg ccggtcattc ccattggtca ccggatctgt cctctgctct ttaccgggtt 180

gatgggtggg gtgctcctta tttctctgtt aactcctccg gtgatatctc cgtccggcca 240

catggtacgg atactcttcc tcaccaggag attgaccttc ttaaggttgc gaagaaggcg 300

gctgacccga aacatttggg tgggcttgga cttcagatgc ctcttgttgt tcgtttccct 360

gatattctga agaaccgttt ggagactttg caatcggctt ttgatatggc ggttcgttcc 420

aggggatatg aggctcatta ccaaggtgtt tatcctgtga aatgtaatca agacaggttc 480

gtggtggaag atatcgtgaa attcggatcg ccatatcgat tcgggttgga agccgggtcg 540

aaaccggagc tccttttggc catgaactgt ctgtccaagg gcagcgctga tgctcttctt 600

gtttgcaatg gtttcaagga tactgagtat atttcgcttg ctttgatcgc aagaaagctc 660

cttttgaaca ctgtaattgt gcttgaacaa gaggaggagc ttgacctggt gattgatatc 720

agccgtaaga tggctgtccg gcccgtaatt ggacttcgtg ctaagctgag gaccaagcat 780

tcgggccatt ttggatccac ttctggagaa aagggcaaat ttgggttgac aacaactcag 840

attcttcgtg tagtgaagaa gttggagggg tctgggatgc ttgattgtct tcagttattg 900

cattttcaca ttggatctca gatcccaaca acggagttgc ttgctgatgg tgttggtgag 960

gccactcaga tttactctga gttagtccgt cttggagctg gtatgaaatt cattgatatt 1020

ggaggtggcc ttggaattga ctatgacggt tcgaaatcat ccgattcgga tgtctctgtt 1080

gcccatggca ttgaggaata tgcctctgct gttgtccagg ctgtccaatt tgtctgtgac 1140

cgtaagggcg ttaagcatcc agtgatttgc agcgaaagtg gcagggcaat tgtttctcac 1200

cattcaatta tgatttttga agctgtgtct gcttctacta ctaatgtttc tccacagctg 1260

tcttccggtg gtcttcaatc actggcggaa actctcaatg aagatgcccg tgctgattac 1320

cgaaacctat ctgctgctgc tgtccgtggc gaatatgata catgtctcct ttactctgat 1380

cagttgaaac agagatgtgt ggaacagttc aatgatggtt ccttggatat tgagcagctt 1440

gctgcagtgg atagcatctg tgacttggtg tcgaaagcta tcggggtttc tgatcctgtt 1500

cgcgcttacc atgtgaatct gtcagttttc acctcaattc ctgatttttg ggcatttggc 1560

caattgtttc cgatcgttcc aattcatcgt ttggatgaaa agcctacaat gagaggaata 1620

ctgtcggacc tgacctgtga cagtgatggg aaggtagaca agttcattgg gggcgaatca 1680

agcttgccac tccatgattt gggaagcaat ggtggtgatg gtgggcggta ttatctgggg 1740

atgtttttgg gtggggctta tgaggaggcg ctcggagggc tccacaacct gtttggtgga 1800

ccaagcgtcg tgcgtgtgtt gcagagcgat agccctcaca gcttcgctgt gactcgctct 1860

gtccctggcc cgtcctgtgc tgacgtgctc cgggcgatgc agttcgagcc tgaactcatg 1920

ttcgagactc tcaagcaccg tgcagaggaa tcctttgatc aagaagaaga aatagaagat 1980

aaaggcctgg cctttgaatc tttaatcagc ggcttagctc agtccttcca caacatgcct 2040

taccttgtgg caccttcgtc ttgctgcttc accgcagcaa ccgcgaaagg tgggggctat 2100

tactactaca atgaagacaa tgctgctgat tgtgcaacag cggaggatga gatttggtcc 2160

tattgcactg cttga 2175

<210> 2

<211> 724

<212> PRT

<213> Capsicum annnuum L. cv. Nockwang

<400> 2

Met Pro Ala Leu Gly Cys Cys Val Asp Ala Thr Val Ser Pro Pro Leu
1 5 10 15

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Asp Ser Ser Leu Pro Thr Pro Glu Phe Phe
20 25 30

Ser Ser Gly Val Pro Pro Met Thr Asn Ala Ala Ala Gly His Ser His
35 40 45

Trp Ser Pro Asp Leu Ser Ser Ala Leu Tyr Arg Val Asp Gly Trp Gly

50 55 60

Ala Pro Tyr Phe Ser Val Asn Ser Ser Gly Asp Ile Ser Val Arg Pro
65 70 75 80

His Gly Thr Asp Thr Leu Pro His Gln Glu Ile Asp Leu Leu Lys Val
85 90 95

Ala Lys Lys Ala Ala Asp Pro Lys His Leu Gly Gly Leu Gly Leu Gln
100 105 110

Met Pro Leu Val Val Arg Phe Pro Asp Ile Leu Lys Asn Arg Leu Glu
115 120 125

Thr Leu Gln Ser Ala Phe Asp Met Ala Val Arg Ser Arg Gly Tyr Glu
130 135 140

Ala His Tyr Gln Gly Val Tyr Pro Val Lys Cys Asn Gln Asp Arg Phe
145 150 155 160

Val Val Glu Asp Ile Val Lys Phe Gly Ser Pro Tyr Arg Phe Gly Leu
165 170 175

Glu Ala Gly Ser Lys Pro Glu Leu Leu Leu Ala Met Asn Cys Leu Ser
180 185 190

Lys Gly Ser Ala Asp Ala Leu Leu Val Cys Asn Gly Phe Lys Asp Thr

195 200 205

Glu Tyr Ile Ser Leu Ala Leu Ile Ala Arg Lys Leu Leu Leu Asn Thr

210 215 220

Val Ile Val Leu Glu Gln Glu Glu Glu Leu Asp Leu Val Ile Asp Ile

225 230 235 240

Ser Arg Lys Met Ala Val Arg Pro Val Ile Gly Leu Arg Ala Lys Leu

245 250 255

Arg Thr Lys His Ser Gly His Phe Gly Ser Thr Ser Gly Glu Lys Gly

260 265 270

Lys Phe Gly Leu Thr Thr Thr Gln Ile Leu Arg Val Val Lys Lys Leu

275 280 285

Glu Gly Ser Gly Met Leu Asp Cys Leu Gln Leu Leu His Phe His Ile

290 295 300

Gly Ser Gln Ile Pro Thr Thr Glu Leu Leu Ala Asp Gly Val Gly Glu

305 310 315 320

Ala Thr Gln Ile Tyr Ser Glu Leu Val Arg Leu Gly Ala Gly Met Lys

325 330 335

Phe Ile Asp Ile Gly Gly Gly Leu Gly Ile Asp Tyr Asp Gly Ser Lys

340 345 350

Ser Ser Asp Ser Asp Val Ser Val Ala His Gly Ile Glu Glu Tyr Ala

355 360 365

Ser Ala Val Val Gln Ala Val Gln Phe Val Cys Asp Arg Lys Gly Val

370 375 380

Lys His Pro Val Ile Cys Ser Glu Ser Gly Arg Ala Ile Val Ser His

385 390 395 400

His Ser Ile Met Ile Phe Glu Ala Val Ser Ala Ser Thr Thr Asn Val

405 410 415

Ser Pro Gln Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gln Ser Leu Ala Glu Thr Leu

420 425 430

Asn Glu Asp Ala Arg Ala Asp Tyr Arg Asn Leu Ser Ala Ala Ala Val

435 440 445

Arg Gly Glu Tyr Asp Thr Cys Leu Leu Tyr Ser Asp Gln Leu Lys Gln

450 455 460

Arg Cys Val Glu Gln Phe Asn Asp Gly Ser Leu Asp Ile Glu Gln Leu

465 470 475 480

Ala Ala Val Asp Ser Ile Cys Asp Leu Val Ser Lys Ala Ile Gly Val

485 490 495

Ser Asp Pro Val Arg Ala Tyr His Val Asn Leu Ser Val Phe Thr Ser

500 505 510

Ile Pro Asp Phe Trp Ala Phe Gly Gln Leu Phe Pro Ile Val Pro Ile

515 520 525

His Arg Leu Asp Glu Lys Pro Thr Met Arg Gly Ile Leu Ser Asp Leu

530 535 540

Thr Cys Asp Ser Asp Gly Lys Val Asp Lys Phe Ile Gly Gly Glu Ser

545 550 555 560

Ser Leu Pro Leu His Asp Leu Gly Ser Asn Gly Gly Asp Gly Gly Arg

565 570 575

Tyr Tyr Leu Gly Met Phe Leu Gly Gly Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Gly

580 585 590

Gly Leu His Asn Leu Phe Gly Gly Pro Ser Val Val Arg Val Leu Gln

595 600 605

Ser Asp Ser Pro His Ser Phe Ala Val Thr Arg Ser Val Pro Gly Pro

610 615 620

Ser Cys Ala Asp Val Leu Arg Ala Met Gln Phe Glu Pro Glu Leu Met

625 630 635 640

Phe Glu Thr Leu Lys His Arg Ala Glu Glu Ser Phe Asp Gln Glu Glu

645 650 655

Glu Ile Glu Asp Lys Gly Leu Ala Phe Glu Ser Leu Ile Ser Gly Leu

660 665 670

Ala Gln Ser Phe His Asn Met Pro Tyr Leu Val Ala Pro Ser Ser Cys

675 680 685

Cys Phe Thr Ala Ala Thr Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asn

690 695 700

Glu Asp Asn Ala Ala Asp Cys Ala Thr Ala Glu Asp Glu Ile Trp Ser

705 710 715 720

Tyr Cys Thr Ala